2 月 February
2019, 62(2): 181 – 192

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http: // www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2019. 02. 005

棉铃虫围食膜的蛋白质组鉴定

梁振普, 王 亮, 李鹏娟, 王朝兴, 肖宇博, 张小霞*

(河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】围食膜(peritrophic membrane, PM)是昆虫抵御随食物摄入的病原微生物入侵的第一道天然屏障。本研究旨在鉴定出农业重大害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 围食膜的总蛋白成分,为进一步揭示昆虫围食膜的形成机制及研发新颖的害虫控制策略奠定基础。【方法】剥离棉铃虫 5 龄幼虫 PM,用三氟甲磺酸(trifluoromethane-sulfonic acid, TFMS)处理,采用液质联用技术(LC-MS/MS)鉴定围食膜蛋白质组,然后对鉴定结果进行生物信息学分析。【结果】本研究共鉴定出棉铃虫幼虫围食膜蛋白质 169 个,是目前鉴定最多的棉铃虫围食膜蛋白。通过 GO 分析,可以将这些鉴定的蛋白分为细胞组分、分子功能和生物学过程三大类;KEGG 富集结果显示,鉴定蛋白可以富集在 12 条代谢通路中;蛋白互作分析(protein-protein interaction, PPI)结果表明,以 ACC 和 CG3011 等蛋白为核心可以形成蛋白互作网络。【结论】本研究鉴定了 169 个棉铃虫幼虫围食膜蛋白质,并对其进行了 GO, KEGG 和 PPI 分析,结果有助于人们全面理解昆虫围食膜的分子结构和功能。

关键词: 棉铃虫; 围食膜; 蛋白质组; 液质联用技术; 生物信息学

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)02-0181-12

Proteomic identification of the peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

LIANG Zhen-Pu, WANG Liang, LI Peng-Juan, WANG Zhao-Xing, XIAO Yu-Bo, ZHANG Xiao-Xia*

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:【Aim】The peritrophic membrane (PM) is the first natural barrier against the invasion of microbes ingested with foods in insects. This study aims to identify the total protein constituents of the peritrophic membrane of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, a major agricultural insect, so as to lay a foundation for further revealing the formation mechanism of PM and developing novel pest control strategies.【Methods】The PMs of the 5th instar larvae of *H. armigera* were peeled off and then treated with trifluoromethane-sulfonic acid (TFMS). The peritrophic membrane proteome of larvae was identified by liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS), and the identified results were subjected to bioinformatics analysis.【Results】In this study we identified a total of 169 peritrophic membrane proteins from *H. armigera* larvae, which is the highest number of PM proteins identified in *H. armigera* up to date. GO analysis revealed that these identified proteins could be divided into three major categories, *i. e.*, cellular component (CC), molecular function (MF) and biological process (BP). The KEGG enrichment results showed that the identified proteins could be enriched in 12 metabolic pathways. The results of protein-protein interaction (PPI) analysis indicated that ACC and CG3011 proteins could serve as the core protein-protein interaction network.【Conclusion】In this study 169 peritrophic

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570151, 31490601); 河南省高校科技创新人才项目(17HASTIT039); 河南省高校重点科研项目(16A180044); 河南省科技攻关项目(102102110151, 172102110059)

作者简介: 梁振普, 男, 1976 年 6 月生, 河南濮阳人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫病毒分子生物学, E-mail: lzpbio@126. com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lzpzxx@126. com

收稿日期 Received: 2018-06-09; 接受日期 Accepted: 2018-10-08

membrane proteins were identified from *H. armigera* larvae and subjected to GO, KEGG and PPI analyses. The results are helpful to comprehensively understand the molecular structure and function of PM in insects.

Key words: *Helicoverpa armigera*; peritrophic membrane; proteome; liquid chromatography and mass spectrometry; bioinformatics

昆虫围食膜(peritrophic membrane, PM)是中肠细胞分泌的一层无色、透明、具有一定韧性的非细胞半透膜,由蛋白质、粘多糖和几丁质组成。PM 位于中肠细胞和肠腔之间,是昆虫肠道上皮细胞和食物之间的一个物理屏障,因此 PM 是昆虫抵御随食物摄入的病原微生物入侵的第一道天然屏障(Wang and Granados, 1998)。PM 不但能够阻挡昆虫病毒和细菌等微生物,而且可以避免有害物质、细菌毒素、固体颗粒与肠道上皮细胞的直接接触,如滴滴涕(DDT)、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 毒素等(Tellam, 1996; Hayakawa *et al*., 2004; Hegedus *et al*., 2009)。实验证明,昆虫病毒增效蛋白、几丁质酶、刚果红、荧光增白剂和外源凝集素等生物防治促进因子通过作用围食膜上特异蛋白质,可破坏围食膜结构,改变其通透性,从而促进病原微生物对昆虫的感染(郭慧芳等, 2003; 朱蓉等, 2003; 张小霞等, 2006),因此基于 PM 可以开发新颖的害虫生物防治策略。

对 PM 蛋白质组成分的鉴定,有助于彻底阐明 PM 的形成及功能机制。目前,有 6 种昆虫的 PM 蛋白质组被完成解析,它们分别是来自鳞翅目的蓓带夜蛾 *Mamestra configurata*(Toprak *et al*., 2016)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Campbell *et al*., 2008)和家蚕 *Bombyx mori*(Hu *et al*., 2012; Zhong *et al*., 2012),以及来自双翅目的家蝇 *Musca domestica*(Wang *et al*., 2016)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*(Dinglasan *et al*., 2009)和刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans*(Rose *et al*., 2014)。研究发现,在对围食膜蛋白质解析的研究过程中,随着质谱技术的发展和对 PM 的处理方式不同,鉴定的蛋白质结果差异较大,例如 Campbell 等(2008)通过质谱只鉴定出了 41 种棉铃虫幼虫的围食膜蛋白质,而 Wang 等(2016)对家蝇幼虫的围食膜蛋白质组研究时解析出了 374 种蛋白质。棉铃虫属鳞翅目夜蛾科(Noctuidae),广泛分布于亚洲、欧洲、非洲及大洋洲等地,可危害棉花、玉米、番茄等多种农作物,是农业生产上的重要害虫,并且棉铃虫具有较强的对杀虫剂产生抗药性的前适应能力(高宗仁等, 2001)。为了针对 PM 开发高效的生物杀虫剂,本研究以棉铃虫幼虫为对象,开展了棉铃虫幼虫围食膜蛋白质组的鉴定工作。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫幼虫由中国科学院武汉病毒研究所动物房提供,棉铃虫是在温度为 28℃,相对湿度为 75%,光周期为 16L:8D 的培养箱中用人工饲料进行培养。

供试人工饲料(卓乐姒等, 1981)主要成分及用量:熟大豆粉 20 g,玉米粉 30 g,大麦粉 30 g,抗坏血酸 1 g,干酵母 8 g,琼脂 3.5 g,苯甲酸钠 0.8 g,棉油 0.5 mL,36% 醋酸 6 mL,10% 甲醛 1 mL,水 200 mL。

饲养器具:24 孔养虫盒,外部大小为 12.5 cm × 8.5 cm × 2.5 cm,内部有 24 个小格(大小为 2 cm × 2 cm × 2.5 cm),加盖配套的盒盖。每格饲养 1 头棉铃虫幼虫,将棉铃虫幼虫饲养至 5 龄。

1.2 棉铃虫围食膜总蛋白的准备

人工饲养棉铃虫幼虫至 5 龄,将幼虫至冰上麻醉,解剖幼虫,剥离围食膜,用去离子水充分清洗至无色透明,保存于 −70℃ 备用。参照 Edge(2003)的方法处理 PM,即用三氟甲磺酸(trifluoromethanesulfonic acid, TFMS)处理 PM,然后煮沸 5 ~ 10 min,利用 TFMS 处理后可以使 PM 上的蛋白质全部释放。

1.3 液质联用技术鉴定棉铃虫围食膜总蛋白质

在进行质谱鉴定之前,先用 SDS-PAGE 对 1.2 节制备的蛋白样品进行检测。本研究为了检测到痕量蛋白质,采用了直接在蛋白溶液中进行胰蛋白酶酶解的方法,然后将酶解得到的肽段混合物冻干。用肽重溶液(0.1% 甲酸、2% 乙腈的水溶液)重悬肽段混合物,利用液相色谱(liquid chromatograph, LC)技术进行肽段的分离。液相色谱采用 Eksigent nanoLC-Ultra™ 2D 系统(AB SCIEX),将溶解后的样品以 4 μL/min 的流速上样到 C18 预柱上(75 μm × 15 cm, C18, 3 μm, 120 Å),然后保持流速冲洗脱盐 10 min。本研究所用分析柱是 C18 反相色谱柱(75 μm × 15 cm, C18, 3 μm, 150 Å),流动相 A 是

5% 乙腈,0.1% 甲酸,流动相 B 是 100% 乙腈,0.1% 甲酸。实验所用梯度为 70 min 内流动相 B 由 5% 升高至 35% 。

本研究质谱采用 TripleTOF 5600 系统(AB SCIEX),喷雾电压为 2.5 kV,质谱扫描为 TOF-MS。在信息相关采集(Information Dependent Analysis, IDA)工作模式下,图谱数据扫描时间为 250 ms。

数据处理采用 Mascot 2.3 软件(Matrix Science)进行,数据库为已完成基因组测序的鳞翅目菜蛾科昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 和鳞翅目夜蛾科昆虫,质谱(MS)容差为 ±0.03 D,串联质谱(MS/MS)容差为 ±0.09 D,Protein score C.I.% 大于 95% 为鉴定成功。

1.4　生物信息学分析

将鉴定的蛋白质进行 Gene Ontology(GO)功能注释,GO 分析使用的是 Quick GO 数据库,同时采用了一些比如 fish 测验等统计学方法以获得 *P* 值。NCBI, KEGG 和 GO 等公共数据库的数据被用来产生蛋白识别号(protein ID)和 GO 信息之间的连接关系。然后将其按细胞组分(cellular component, CP)、分子功能(molecular function, MF)和生物学过程(biological process, BP) 3 个 GO 数据库做功能分类及富集分析;同时将鉴定蛋白进行基于 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库富集分析和蛋白互作(protein-to-protein interaction, PPI)分析,其中 PPI 分析采用的是 String 数据库。运用 *P* 值分析法进行显著性分析:第 1 步建立无效假设;第 2 步选择适当的统计方法计算假设成立的可能性即概率有多大,概率用 *P* 值表示;第 3 步显著性水平 $P<0.05$ 时,拒绝假设,样本差异显著,反之 $P>0.05$,接收假设,样本差异不显著。利用在线软件 BLAST 进行蛋白相似性分析(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)。

2　结果

2.1　棉铃虫 PM 蛋白质的鉴定

本研究中为了尽可能地释放全部的围食膜蛋白,利用 TFMS 处理 PM,并采用液相酶解的方法,鉴定结果时所用的匹配数据库是混合数据库,即包括已完成测序的鳞翅目菜蛾科昆虫小菜蛾和鳞翅目夜蛾科昆虫。LC-MS/MS 结果鉴定出了 169 个棉铃虫幼虫围食膜蛋白质(表 1),本研究鉴定出的蛋白质远远高于前人的鉴定结果(Campbell *et al.*, 2008)。进一步的分析表明,在成功鉴定的 169 个蛋白中,有 18 个蛋白质只检测出了 1 个特异肽段,其余的蛋白质均检测到了大于 1 个的特异肽段,最多的鉴定出了 240 个肽段。

表 1　鉴定出的 169 种棉铃虫幼虫围食膜蛋白

Table 1　169 peritrophic membrane proteins identified from *Helicoverpa armigera* larvae

蛋白 ID Protein ID	蛋白 Protein	蛋白注释 Protein annotation
283826819	cda5a	甲壳素脱乙酰酶 Chitin deacetylase 5a
346987767	arylphorin	芳基贮存蛋白 Arylphorin
Px015950.1	Smg5	LD36341p
2463084	SR66	类胰蛋白酶 Trypsin-like protease
Px015584.1	SdhA	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚单位 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
Px000780.1	CG17209	DNA 指导 RNA 聚合酶亚基 DNA-directed RNA polymerase subunit
156968303	SerProx-4	蛋白酶 Protease
30961819	APN4	中肠氨肽酶 N4 midgut aminopeptidase N4
49168687	ca42	羧肽酶前体 Carboxypeptidase precursor
304443595	SP24	丝氨酸蛋白酶 24 Serine protease 24
2463062	SR15	类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin-like protease
157927725	β-Actin	β-肌动蛋白 Beta actin
302595185	HM72	粘蛋白 Mucin protein
156968299	GH16beta1,3glucanase-1	β-1,3-葡聚糖酶 Beta-1,3-glucanase
194295558	ALP2	碱性磷酸酶 2 Alkaline phosphatase 2
Px000343.1	CG6287	GH03305p
171740921	IIM4	昆虫肠粘蛋白 4 Insect intestinal mucin 4
Px015587.1	CG5214	GM01350p

续表 1 Table 1 continued

蛋白 ID Protein ID	蛋白 Protein	蛋白注释 Protein annotation
Px017125.1	AdSS	腺苷酸琥珀酸合成酶 Adenylosuccinate synthetase
161138537	IIM46	肠粘蛋白 IIM-46 Intestinal mucin IIM-46
Px014370.1	Lon	Lon 蛋白酶同源体 Lon protease homolog
Px002821.1	cmb	Combover, isoform A
323471674	HaC5S00613	聚钙素 Polycalin
171740919	IIM3	昆虫肠粘蛋白 3 Insect intestinal mucin 3
Px000777.1	EfTuM	延伸因子 Tu Elongation factor Tu
Px014353.1	CG10694	AT15685p
Px000342.1	CG10253	烷基二羟基丙酮磷酸合成酶 Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase
440211509		假定烯醇化酶 Putative enolase protein
54310832	HpF1A	胰凝乳蛋白酶原 Chymotrypsinogen
Px017808.1	Top2	DNA 拓扑异构酶 2 DNA topoisomerase 2
Px000247.1	Taldo	假定的转醛酶 Probable transaldolase
Px017966.1	l(1)G0156	假定的异柠檬酸脱氢酶[NAD]α 亚基 Probable isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
Px000239.1	r	CAD protein
Px000245.1	Hsc70-5	热休克 70 kDa 蛋白质同源物 5 Heat shock 70 kDa protein cognate 5
Px015299.1	Nup75	核孔复合蛋白 Nup75 Nuclear pore complex protein Nup75
158347512		假定的类胰凝乳蛋白酶 Putative chymotrypsin-like proteinase
Px016517.2	CG8483	LD39025p
Px017738.1	Zw	葡萄糖-6-磷酸 1-脱氢酶 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
Px017732.1	AspRS-m	天冬氨酰-tRNA 合成酶,A 型 Aspartyl-tRNA synthetase, isoform A
2463082	SR65	异型丝氨酸蛋白酶 Diverged serine protease
Px001209.1	CG9314	CG9314 protein
Px014123.1	Mdr50	LP14331p
161281	ubiquitin	泛素 Ubiquitin
Px002219.1	nonC	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Smg1 Serine/threonine-protein kinase Smg1
Px010658.1	ico	伸长因子 G Elongation factor G
Px017787.1	snk	Serine protease snake
Px015857.1	CG5250	AT04468p
Px006457.3	brp	Bruchpilot, isoform J
Px010604.1	CG3011	丝氨酸羟甲基转移酶,A 型 Serine hydroxymethyl transferase, isoform A
Px015290.1	CG11837	假定的二甲基腺苷转移酶 Probable dimethyladenosine transferase
Px017114.1	ATPsynbetaL	ATP 合成酶 β 亚基 ATP synthase subunit beta
Px012761.2	yl	假定的卵黄蛋白原受体 Putative vitellogenin receptor
156968285	GH13Amy-1	α-淀粉酶 Alpha-amylase
Px005029.1	His3	组蛋白 H3 Histone H3
Px014563.1	Vha36-3	假定的 V 型质子 ATP 酶 D2 亚基 Probable V-type proton ATPase subunit D2
Px002486.1	CG7275	LD28275p
Px010715.2	CG5214	GM01350p
Px000985.1	TBCD	LD16031p
Px007522.1	PCB	丙酮酸羧化酶 Pyruvate carboxylase
Px000591.1	Mdr65	Multidrug resistance protein homolog 65
Px005481.1	CG3098	LP04564p
268630596	COI	细胞色素氧化酶亚基 1 Cytochrome oxidase subunit 1
Px016114.1	Aldh	醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase
388540206		类载脂蛋白 D apolipoprotein D-like protein
Px000270.1	mts	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2A Serine/threonine-protein phosphatase PP2A

续表 1 Table 1 continued

蛋白 ID Protein ID	蛋白 Protein	蛋白注释 Protein annotation
Px015156.1	mRpS2	线粒体核糖体蛋白 S2 Mitochondrial ribosomal protein S2
Px004808.1	LeuRS-m	LD44376p
Px003663.1	KrT95D	Krueppel target at 95D, isoform A
Px009393.2	DhpD	鸟嘌呤脱氨酶 Guanine deaminase
Px003746.1	Uba3	Nedd8 活化酶 E1 催化亚基 Nedd8-activating enzyme E1 catalytic subunit
Px007115.2	HisRS	组氨酰-tRNA 合成酶,D 型 Histidyl-tRNA synthetase, isoform D
Px000809.1	shot	Short stop, isoform H
Px013154.1	CG2990-RB	FI06813p
Px016017.1	ACC	乙酰辅酶 A 羧化酶,A 型 Acetyl-CoA carboxylase, isoform A
Px001026.10	Plp	类中心粒周围蛋白,F 型 Pericentrin-like protein, isoform F
Px000213.4	Rpn12R	AT18239p
Px009990.1	epsilonTry	胰蛋白酶 ε Trypsin epsilon
Px010314.1	orb2	Translational regulator orb2
Px014146.1	pnut	Protein peanut
Px002454.1	Gl	动力蛋白激活蛋白亚基 1 Dynactin subunit 1
209364403	Parg	假定蛋白 Hypothetical protein
Px012466.1	Sec71	多糖苷水解酶 Poly(ADP-ribose) glycohydrolase
Px009795.1	CG3358	LD29171p
Px009222.1	Xe7	CG3358, isoform E
Px009932.1	Cyp4d8	Xe7, isoform A
Px000631.1	Cyp4d8	细胞色素 P450 Cytochrome P450 4d8
Px005969.1	NLaz	Neural lazarillo, isoform B
147953428	lipase	脂肪酶 Lipase
Px000530.1	NAT1	NAT1, isoform D
Px007399.1	CG1774	GH08048p
Px000538.1	Psa	FI19310p1
Px002668.2	beta-Man	β-甘露糖苷酶,A 型 Beta-Mannosidase, isoform A
Px013909.1	CG1299	未知蛋白,A 型 Uncharacterized protein, isoform A
Px001705.1	CG14516	氨肽酶 Aminopeptidase
16566719	S3P	核糖体蛋白 S3 Ribosomal protein S3
Px017659.1	slif	LD37241p
Px004783.1	Sik2	FI24002p1
Px011641.3	vanin-like	Vanin-like protein 1
Px007071.1	Hmt4-20	组蛋白-赖氨酸 N-甲基转移酶 Suv4-20 Histone-lysine N-methyltransferase Suv4-20
15212555	APN1	氨肽酶 N Aminopeptidase N
Px015622.1	CG7845	CG7845, isoform A
Px009294.2	Dis3	Dis3, isoform A
Px016932.2	Gclm	GH03051p
Px007341.1	CG12050-RB	FI12406p
18253053	L34E	核糖体蛋白 L34 Ribosomal protein L34
74831719	cpb	羧肽酶 B 前体 Carboxypeptidase B precursor
Px004932.1		未知蛋白 Uncharacterized protein
Px006518.1	alph	Alphabet, isoform E
Px009683.1	ND-51L1	NADH 脱氢酶 51kDa 类亚基 1 NADH dehydrogenase 51 kDa subunit-like 1
Px015375.1	Mal-A3	麦芽糖酶 A3 Maltase A3
Px007556.1	BcDNA.GH08420	BcDNA.GH08420
Px006375.1	fu	Serine/threonine-protein kinase fused

续表 1 Table 1 continued

蛋白 ID Protein ID	蛋白 Protein	蛋白注释 Protein annotation
Px005642.1	CG1105	LD44267p
Px012967.1	CG9934	LD24832p
Px012115.1	Ost48	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
Px016226.1	Mer	Moesin/ezrin/radixin homolog 2
Px015073.1	trx	H 组蛋白-赖氨酸 N-甲基转移酶 Istone-lysine N-methyltransferase trithorax
Px000832.3	nesd	Protein nessun dorma
Px009977.1	CarT	癌转运体蛋白 Carcinine transporter
Px011611.1	CG6543	CG6543, isoform A
Px010052.1	Nup50	核孔复合蛋白 Nup50 Nuclear pore complex protein Nup50
Px004032.1	sqd	RNA-binding protein squid
Px003500.1	CG10011	未知蛋白 Uncharacterized protein
Px014528.1	CG7084	RH23644p
Px017866.1	ade5	多功能蛋白质 ADE2 Multifunctional protein ADE2
Px017578.1	Nmdmc	双功能亚甲基四氢叶酸脱氢酶/环化水解酶 Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase
Px005175.1	tweek	Tweek, isoform J
Px002020.1	gus	Protein gustavus
Px014345.1	mre11	Endo /核酸外切酶 Mre11 Endo/exonuclease Mre11
Px003544.1		未知蛋白 Uncharacterized protein
Px002693.1	disco-r	Disco-related, isoform A
Px016040.1	Dscam3	Down syndrome cell adhesion molecule 3, isoform E
Px017932.1	dikar	Dikar, isoform F
Px017339.1	CG8142	LD35209p
Px014895.1	in	Protein inturned
Px008567.1	unc-13	Unc-13, isoform E
Px008408.1	CG42326	未知蛋白,E 型 Uncharacterized protein, isoform E
Px009818.1	AOX4	醛氧化酶 4 Aldehyde oxidase 4
Px008832.1	Taf5	转录起始因子 TFIID 亚基 5 Transcription initiation factor TFIID subunit 5
Px012605.1	mys	整合素 β-PS Integrin beta-PS
Px008255.1	CG1718	未知蛋白,B 型 Uncharacterized protein, isoform B
Px003269.1		未知蛋白 Uncharacterized protein
Px013443.1	CG18128	FI08065p
Px007108.1	Muc68D	GH09355p
Px012513.2	Rbp	RIM 结合蛋白,F 型 RIM-binding protein, isoform F
Px006709.2	Vha68-2	V 型质子 ATP 酶催化亚基 A,2 型 V-type proton ATPase catalytic subunit A isoform 2
Px001589.1	CG10345	FI07620p
Px001787.1	DCP1	Decapping protein 1, isoform A
Px008900.1	beta3GalTII	己糖转移酶 Hexosyltransferase
Px001714.1	TBC1D5	GH10459p
Px011719.1	l(2)k09913	LD15586p
Px014131.1	Cht2	假定的几丁质酶 2 Probable chitinase 2
Px015816.1	dpr5	Defective proboscis extension response 5, isoform A
Px005882.1	CG7742	GH15768p
Px016535.2	CG3961-RA	LD09909p
Px007801.1	Snx1	FI18122p1
Px014213.2	Irp-1B	铁调节蛋白 1B Iron regulatory protein 1B

续表 1 Table 1 continued

蛋白 ID Protein ID	蛋白 Protein	蛋白注释 Protein annotation
Px005225.1	CG34348	LP13185p
Px001248.1	TrissinR	Trissin receptor
Px017549.1	CG1824	GH19726p
Px000719.2	nAChRalpha2	类乙酰胆碱受体亚基 α2 Acetylcholine receptor subunit alpha-like 2
Px004697.1	rdo	Reduced ocelli, isoform B
Px002001.1	CG7747	CG7747
Px001980.2	Cul2	Cullin 蛋白 A 型 Cullin 2, isoform A
Px017182.1	Ppcdc	LD37882p2
Px011054.1	CG6415	氨基甲基转移酶 Aminomethyltransferase
Px001280.2	hng2	铰链蛋白 2 Hinge2
Px010277.2	GATAe	GATAe, isoform A
158347490		假定的类胰蛋白酶 Putative trypsin-like proteinase

2.2　鉴定到的棉铃虫 PM 蛋白的分析

为了明确所鉴定蛋白在 PM 发挥不同功能中的作用，本研究对鉴定蛋白进行了 GO 分析。GO 数据库主要包括 BP，CC 和 MF 3 个主要部分。结果显示，本研究被鉴定的蛋白被富集到 1 698 条 BP，316 条 CC，以及 448 条 MF。经过显著性检验后，达到显著富集的 BP 最多(249 条)，其次是 MF(163 条)，CC 较少(73 条)(图 1)。

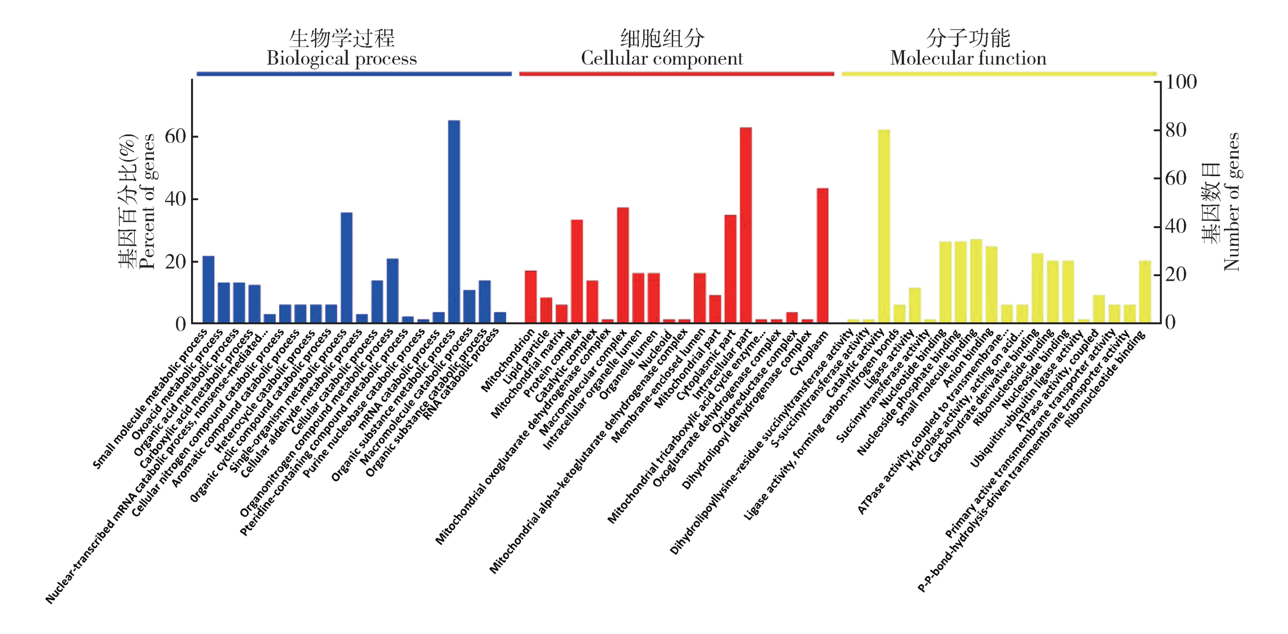


图 1　鉴定到的棉铃虫幼虫围食膜蛋白 GO 富集分析中最明显的前 20 条

Fig. 1　The most obvious top 20 of the GO enrichment analysis of the identified peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera* larvae

分析被显著富集到 BP 数据库中的 249 条 term，结果显示涉及的生物学过程主要包括：各种物质代谢过程，例如鉴定出参与小分子代谢过程(small molecule metabolic process)蛋白 28 个、单生物体代谢过程(single-organism metabolic process)蛋白 46 个、有机氮化合物代谢过程(organonitrogen compound metabolic process)蛋白 27 个、有机物代谢过程(organic substance metabolic process)蛋白 84 个等。分析被显著富集到 MF 数据库中的 163 条 term，结果显示涉及的分子功能主要包括：鉴定出参与催化活性(catalytic activity)蛋白 80 个、核苷酸结合(nucleotide binding)蛋白 34 个、核苷磷酸结合(nucleotide phosphate binding)蛋白 34 个、小分子结合(small molecule binding)蛋白 35 个等。分析被显

著富集到 CC 数据库中的 73 条 term，结果显示涉及的细胞组成主要包括：鉴定出参与蛋白复合物（protein complex）蛋白 43 个、大分子复合物（macromolecular complex）蛋白 48 个、细胞质部分（cytoplasmic part）蛋白 45 个、胞内部分（intracellular part）蛋白 81 个等。

使用 KEGG 注释系统对鉴定蛋白进行了代谢途径分析，结果表明有 40 个蛋白归属于 12 条通路（$P < 0.05$），进一步的分析表明富集于碳代谢（carbon metabolism）相关蛋白 13 个，赖氨酸降解（lysine degradation）相关蛋白 6 个，柠檬酸循环（citrate cycle）相关蛋白 6 个，ABC 转运蛋白（ABC transporters）3 个，叶酸一碳单位循环代谢（one carbon pool by folate）相关蛋白 3 个，乙醛酸和二羧酸代谢（glyoxylate and dicarboxylate metabolism）相关蛋白 4 个，代谢途径（metabolic pathways）相关蛋白 35 个，氨基酸生物合成（biosynthesis of amino acids）相关蛋白 6 个，色氨酸代谢（tryptophan metabolism）相关蛋白 3 个，脂肪酸生物合成（fatty acid biosynthesis）相关蛋白 2 个，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢（glycine, serine and threonine metabolism）相关蛋白 3 个，以及脂肪酸降解（fatty acid degradation）相关蛋白 3 个（表 2）。相对于鉴定的总蛋白来说，只有 23.7%（40/169）的鉴定蛋白被富集到了已知的代谢途径，暗示目前人们对围食膜蛋白的了解还十分欠缺。

表 2 鉴定到的棉铃虫幼虫围食膜蛋白的 KEGG 富集分析结果

Table 2 KEGG enrichment analysis results of identified peritrophic membrane proteins from *Helicoverpa armigera* larvae

KEGG 通路 KEGG pathway	通路 ID Pathway ID	*P* 值 *P* value	蛋白（蛋白数） Proteins (number of proteins)
碳代谢 Carbon metabolism	dme01200	3.41E-06	SdhA, CG6287, CG5214, Taldo, l(1)G0156, Zw, CG9314, CG3011, CG5214, PCB, CG6543, Irp-1B, CG6415 (13)
赖氨酸降解 Lysine degradation	dme00310	1.41E-04	CG5214, CG5214, Aldh, Hmt4-20, trx, CG6543 (6)
柠檬酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	dme00020	7.53E-04	SdhA, CG5214, l(1)G0156, CG5214, PCB, Irp-1B (6)
ABC 转运蛋白 ABC transporters	dme02010	1.30E-03	Mdr50, CG1718, CG1824 (3)
叶酸一碳单位循环代谢 One carbon pool by folate	dme00670	3.22E-03	CG3011, Nmdmc, CG6415 (3)
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	dme00630	5.56E-03	CG9314, CG3011, Irp-1B, CG6415 (4)
代谢途径 Metabolic pathways	dme01100	5.87E-03	SdhA, CG17209, CG6287, CG5214, AdSS, CG10253, Taldo, l(1)G0156, r, Zw, CG3011, ATPsynbetaL, Vha36-3, CG5214, PCB, Aldh, DhpD, ACC, CG14516, vanin-like, Gclm, ND-51L1, Mal-A3, Ost48, CG6543, ade5, Nmdmc, CG18128, Vha68-2, beta3GalTII, Cht2, CG3961-RA, Irp-1B, Ppcdc, CG6415 (35)
氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	dme01230	5.98E-03	CG6287, Taldo, l(1)G0156, CG3011, PCB, Irp-1B (6)
色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	dme00380	1.24E-02	CG9314, Aldh, CG6543 (3)
脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	dme00061	2.17E-02	ACC, CG3961-RA (2)
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Metabolism of glycine, serine and threonine	dme00260	3.55E-02	CG6287, CG3011, CG6415 (3)
脂肪酸降解 Fatty acid degradation	dme00071	4.24E-02	Aldh, CG6543, CG3961-RA (3)

昆虫围食膜的主要成分包括蛋白质和几丁质，几丁质形成围食膜的基本结构，不同的蛋白质填充于其中形成具有一定孔径的致密结构。对围食膜蛋白的序列分析显示，并不是所有的围食膜蛋白都含有几丁质结合域（chitin binding domain, CBD），因此可知并不是所有的围食膜蛋白都和几丁质结合（Wang and Granados, 2001），可能有很多蛋白可以通过蛋白之间的分子互作而参与维持围食膜的正常结构。本研究对鉴定蛋白也进行了蛋白质互作分析，结果显示，以 ACC 和 CG3011 等蛋白为核心可以形成蛋白互作网络，例如 ACC 可以与鉴定的 12 个蛋白发生互作，CG3011 可以与鉴定的 9 个蛋白发生互作，并且发生互作的蛋白大多数都能被富集到代谢通路（图 2）。

2.3 围食膜因子（peritrophin）的鉴定

昆虫肠粘蛋白（insect intestinal mucin, IIM）是最初被鉴定为围食膜因子的围食膜蛋白质。本研究鉴定出了一个粘蛋白（mucin）HM72 和另外 3 个 IIM

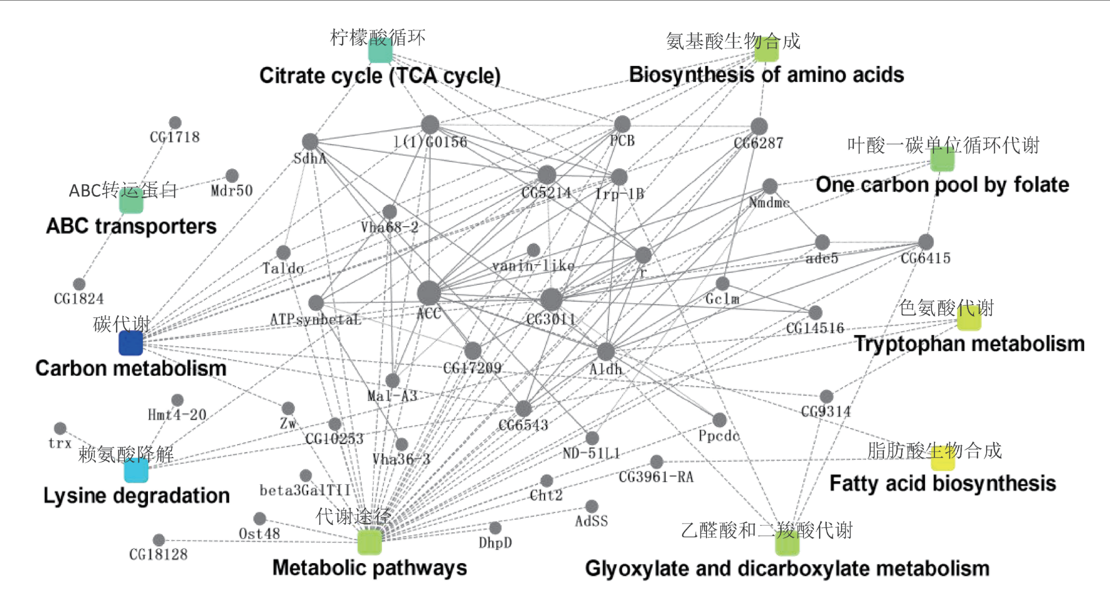


图 2　棉铃虫幼虫围食膜鉴定蛋白间的互作网络图

Fig. 2　Protein-protein interaction networks of identified peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera* larvae

(IIM3, IIM4 和 IIM46)。目前,关于增强蛋白(enhancin)对 IIM 的降解机制目前还不明了,并且是否所有的 IIM 都可作为增强蛋白的酶解底物也需要进一步的实验证明。

2.4　其他蛋白

基因的水平转移(horizontal gene transfer, HGT)指的是两个亲缘关系较远的物种之间的遗传物质交流。为了探究杆状病毒和昆虫宿主间的 HGT,本研究将质谱结果以棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HaNPV)(GenBank 登录号: NC_003094)基因组为数据库进行了蛋白的鉴定,鉴定出了 9 个杆状病毒同源物,它们的 GenBank 登录号分别为: 12483846(未知蛋白), 12483806(LEF-9), 209364308(ORF1629), 12483771(P74), 12483840(P40, BV/ODV capsid protein 42), 12483811(bro), 1762996(RING-finger protein/hoar), 12483787(LEF-12)和 12483878(未知蛋白)。

将上述 9 种蛋白在目前 PM 蛋白质组完成解析的 5 种昆虫进行了同源性对比分析。其中 12483846(未知蛋白)和家蝇中假定 G 蛋白偶联受体 MTH2 的同源性较高;12483806(LEF-9)和蓓带夜蛾中 C 型凝集素的同源性较高;209364308(ORF1629)和家蝇中假定 FK506 结合蛋白 5 的同源性较高;12483771(P74)和家蚕中 Chaoptin 的同源性较高;12483840(P40, BV/ODV capsid protein 42)和蓓带夜蛾中丝氨酸蛋白酶 60 的同源性较高;12483811(bro)和家蚕中 bro-d 的同源性较高;1762996(RING-finger protein/hoar)和家蚕中 R3H 结构域蛋白 2 的同源性较高;12483787(LEF-12)和疟蚊中 AGAP012388-PA 的同源性较高;12483878(未知蛋白)和家蝇中未知蛋白 LOC109614204 的同源性较高。

3　讨论

传统上人们根据抽提的难易程度将围食膜上的蛋白质分为 4 类:溶于生理盐水的蛋白(Ⅰ)、溶于弱表面活性剂的蛋白(Ⅱ)、溶解于强的变性剂的蛋白(Ⅲ)和不溶于强变性剂的蛋白(Ⅳ),而且早期鉴定的围食膜蛋白质多属于第Ⅲ类。已有的鉴定结果表明,鳞翅目昆虫 PM 的蛋白质种类鉴定结果差异较大,尤其对同一种昆虫来说。Campbell 等(2008)报道利用无水三氟甲烷磺酸(TMFS)可以溶解包括几丁质在内的全部围食膜组分,研究以棉铃虫 *H. armigera*、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和烟芽夜蛾 *Helicoverpa virescens* 为目标数据库,结果鉴定出了 41 种蛋白。Hu 等(2012)对家蚕的围食膜进行鉴定分析,结果鉴定出 47 种蛋白。而 Zhong 等(2012)对家蚕的围食膜蛋白鉴定结果为 305 种蛋白。Toprak 等(2016)对蓓带夜蛾的围食膜蛋白鉴定得出的结果是 82 种。本研究对分离的棉铃虫 5 龄幼虫 PM 利用去离子水进行清洗,然后采用 TFMS 处理,拟鉴定的是几乎所有的围食膜蛋白,以完成测序的鳞翅目

菜蛾科昆虫小菜蛾和鳞翅目夜蛾科昆虫为匹配数据库,LC-MS/MS 结果显示,共鉴定了 169 种棉铃虫的围食膜蛋白,本研究鉴定结果明显多于已有研究鉴定的棉铃虫围食膜蛋白(Campbell *et al*., 2008)。目前,在已完成的 6 种昆虫的 PM 蛋白质组解析中,由于物种的差异会使鉴定的 PM 蛋白数量出现差异,但在 2012 年,家蚕(Hu *et al*., 2012; Zhong *et al*., 2012)的 PM 蛋白鉴定中,他们鉴定的蛋白数量差异较大。所以作者分析造成同一组分蛋白鉴定结果差异明显的原因主要有以下 3 方面:首先,蛋白的处理方式不同可造成样品中蛋白的含量有所差异;再者,随着科技的进步,液相色谱和质谱仪更加精确和准确,会使鉴定的 PM 蛋白增加,而且由于实验时,仪器参数有差异也会使鉴定蛋白数目不同;最后,不同作者在鉴定 PM 蛋白的过程中所选的数据库不同,也会导致最终蛋白鉴定数目有差异。

PM 在昆虫的生活史中扮演着重要的角色,它不仅可以保护昆虫中肠免受食物颗粒、病原微生物和毒素的损害,而且是昆虫通过口服摄入外源物后首次接触的昆虫组织,因此 PM 可以作为发展新颖的害虫控制策略的靶标。为了更好地理解 PM 在怎样执行上述这些功能,有必要明确 PM 的分子结构及形成机制。X-射线衍射和凝结素结合实验显示,几丁质束十字交叉形成 PM 的几丁质网状基本结构,构成围食膜的基本结构(Jang *et al*., 2004)。围食膜因子是一类含有几丁质结合域的围食膜蛋白(彭辉银等, 1998; Wang and Granados, 2001),这些围食膜因子通过 CBD 与几丁质结合决定了围食膜的基本网格结构(Tellam *et al*., 1999)。本实验鉴定的 169 种围食膜蛋白质只有一部分具有几丁质结合域,这些围食膜蛋白一方面通过 CBD 与几丁质结合形成围食膜的基本网格结构;另一方面推测这些蛋白与其他不具有 CBD 的蛋白可以发生分子互作,致使其他蛋白间接地成为围食膜组分。本研究对鉴定蛋白进行了 GO 分析和 KEGG 代谢途径分析,结果表明,大部分蛋白被富集到代谢功能和通路中,这些代谢相关蛋白很可能就是通过和具有 CBD 的蛋白互作,或者它们之间彼此发生分子互作,从而在围食膜的基本网格结构基础上最终形成致密的半透膜结构。结合已有的研究和本研究的鉴定结果,可以得出以下结论:含有几丁质结合域的蛋白质和几丁质结合形成围食膜的基本网格结构,而其他与代谢等相关的蛋白质通过与具有 CBD 的蛋白分子互作,或者这些代谢相关蛋白间的分子互作最终形成致密的半透膜结构。本实验的结果为研究围食膜的形成及功能机制提供了有价值的信息。

已有的研究证明,蛋白质对维持完整的围食膜结构必不可少,蛋白质降解后可使围食膜结构和通透性遭到破坏,最终可导致杆状病毒的侵染力增强(Wang and Granados, 1997)。刚果红可竞争性结合到昆虫中肠围食膜的几丁质上,导致围食膜蛋白质和几丁质的解离(张小霞等, 2006)。荧光增白剂(calcofluor)可以竞争性地结合到中肠新合成的几丁质上,从而阻断围食膜蛋白与几丁质的结合;几丁质酶存在于多种杆状病毒,是一种具有生物催化活性的水解酶,可以降解昆虫体内的几丁质(桂朗等, 2012)。而 IIM 可以被杆状病毒来源的增强蛋白降解,结果导致病毒的侵染力增强(Lepore *et al*., 1996; Wang and Granados, 1997),因此 IIM 可以作为害虫生物控制的新靶标。棉铃虫幼虫的围食膜因子 IIM1 和 IIM2 在前期的研究中被鉴定出来(Campbell *et al*., 2008),而在本研究中的鉴定分析结果中没有发现这两个蛋白。

人们利用系统的生物信息学等手段对家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的基因进行了细致的分析,结果显示,该病毒的尿苷二磷酸葡萄糖转移酶(UGT)基因、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)基因、成纤维细胞因子(FGF)基因、几丁质酶(Chi)基因、凋亡抑制蛋白3(IAP3)基因和尿苷二磷酸葡萄糖转移酶(UGT)基因均有可能来源于其宿主昆虫(Katsuma *et al*., 2008; 段海蓉等, 2011)。Gilbert 等(2016)的研究结果也表明,在杆状病毒的感染过程中,昆虫的 DNA 能整合入杆状病毒的基因组中。本研究将质谱的结果针对杆状病毒 HaSNPV 数据库进行了蛋白鉴定,结果鉴定出了 9 个杆状病毒同源物,暗示杆状病毒和宿主昆虫之间存在 HGT 事件。本研究鉴定的这 9 种蛋白中有 2 个功能未知蛋白,其余蛋白的功能已在杆状病毒中被阐明。*bro* 基因家族是一个多基因家族,在 AcMNPV 中,*bro* 基因的缺失可导致病毒 DNA 复制明显推迟(张楠等, 2016)。RING-finger protein 是 C3HC4 类型家族成员之一,在病毒的侵染周期中发挥着重要的作用(Thiem and Miller, 1989)。将 BmNPV 的 *lef*-9 基因突变后,病毒复制受阻(Ono *et al*., 2012)。在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 中把 BmNPV 的 *lef*-12 基因缺失后,虽然缺失体可以产生有感染能力的病毒粒子,但是在两种细胞系中均观察到 BV 产量降低(为野生型的 20% ~40%),并且感染周期似

乎变慢(Guarino *et al.*, 2002)。P74 是一种经口感染因子,缺失后导致病毒丧失经口感染能力(Kuzio *et al.*, 1989; Faulkner *et al.*, 1997)。研究证明,AcMNPV 的 BV/ODV-C 42 能与 pp78/83 结合并将后者转运入细胞核(Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010),其基因缺失后影响了核衣壳的形成。在 AcMNPV 中,PP78/83(orf1629)是一种 WASP 类蛋白,在病毒感染宿主时,参与核内肌动蛋白的组装使病毒粒子穿过被感染的细胞质(Goley *et al.*, 2006; Ohkawa *et al.*, 2010)。这 9 种蛋白的同源物,有 5 种在昆虫中功能已知。其中,G 蛋白偶联受体 MTH 参与调节果蝇的寿命、应激反应等(张静等, 2011)。烟草天蛾中 C 型凝集素 IMLl 能够增强血细胞的包囊反应(Ling and Yu, 2006)。在果蝇中,Chaoptin 蛋白不仅是不感光细胞形态发生所需的,而且还是细胞黏附分子(Krantz and Zipursky, 1990)。在昆虫中肠中,丝氨酸蛋白酶是一类主要的蛋白酶(Patankar *et al.*, 2001)。R3H 蛋白中其他结构域的功能表明 R3H 结构域可能参与与核酸的相互作用(Grishin, 1998)。而 BRO-d, AGAP012388-PA, 未知蛋白 LOC109614204 和假定 FK506 结合蛋白 5 功能尚未报道。以上是鉴定蛋白在杆状病毒中的功能和进行同源比对分析得到的蛋白的功能,至于本实验鉴定基因在宿主昆虫中的同源物是否具有功能,还需要通过进一步的研究来阐明。

参考文献(References)

Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon KH, 2008. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(10): 950-958.

Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, McHugh CA, Donnelly-Doman M, Carucci DJ, Yates JR, Jacobs-Lorena M, 2009. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(2): 125-134.

Duan HR, Qiu DB, Gong CL, Huang ML, 2011. Analysis of horizontal transfer gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Hereditas (Beijing)*, 33(6): 636-647. [段海蓉, 丘德彬, 贡成良, 黄茉莉, 2011. 家蚕核型多角体病毒水平转移基因分析. 遗传, 33(6): 636-647]

Edge AS, 2003. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem. J.*, 376(2): 339-350.

Faulkner P, Kuzio J, Williams GV, Wilson JA, 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J. Gen. Virol.*, 78(12): 3091-3100.

Gao ZR, Lin S, Guo XQ, Li QS, Qiu F, 2011. A study on the resurgence of cotton bollworm induced by chemical insecticides. *J. Henan Agric. Sci.*, 30(1): 17-19. [高宗仁, 林松, 郭小奇, 李巧丝, 邱锋, 2001. 化学杀虫剂诱发棉铃虫再猖獗的研究. 河南农业科学, 30(1): 17-19]

Gilbert C, Peccoud J, Chateigner A, Moumen B, Cordaux R, Herniou EA, 2016. Continuous influx of genetic material from host to virus populations. *PLoS Genet.*, 12(2): e1005838.

Goley ED, Ohkawa T, Mancuso J, Woodruff JB, D'Alessio JA, Cande WZ, Volkman LZ, Welch MD, 2006. Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WAPS-like protein. *Science*, 314(5798): 464-467.

Grishin NV, 1998. The R3H motif: a domain that binds single-stranded nucleic acids. *Trends Biochem. Sci.*, 23(9): 329-330.

Guarino LA, Mistretta TA, Dong W, 2002. Baculovirus lef-12 is not required for viral replication. *J. Virol.*, 76(23): 12032-12043.

Gui L, Wang B, Wang LY, Li FH, Xiang JH, 2012. Review on structure and function of insect peritrophic membrane for facilitating research on prevention of WSSV disease in shrimp. *Marine Sci.*, 36(4): 126-131. [桂朗, 王兵, 王丽燕, 李富花, 相建海, 2012. 昆虫围食膜结构与功能概述及其对对虾 WSSV 病防治研究的启示. 海洋科学, 36(4): 126-131]

Guo HF, Fang JC, Han ZJ, 2003. Advances in insect virus synergists. *Acta Entomol. Sin.*, 46(6): 766-772. [郭慧芳, 方继朝, 韩召军, 2003. 昆虫病毒增效剂研究进展. 昆虫学报, 46(6): 766-772]

Hayakawa T, Shitomi Y, Miyamoto K, Hori H, 2004. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. *FEBS Lett.*, 576(3): 331-335.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U, 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 54: 285-302.

Hu XL, Chen L, Xiang XW, Yang R, Yu SF, Wu XF, 2012. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth-instar larvae, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.*, 39(4): 3427-3434.

Jang MK, Kong BG, Jeong YI., Chang HL, Nah JW, 2004. Physicochemical characterization of α-chitin, β-chitin, and γ-chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 42(14): 3423-3432.

Katsuma S, Kawaoka S, Mita K, Shimada T, 2008. Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(12): 1080-1086.

Krantz DE, Zipursky SL, 1990. *Drosophila* chaoptin, a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. *EMBO J.*, 9(6): 1969-1977.

Kuzio J, Jaques R, Faulkner P, 1989. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*, 173(2): 759-763.

Lepore LS, Roelvink PR, Granados RR, 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections,

is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol*., 68(2): 131–140.

Li K, Wang Y, Bai HM, Wang Q, Song JH, Zhou Y, Wu CC, Chen XW, 2010. The putative pocket protein binding site of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus BV/ODV-C42 is required for virus-induced nuclear actin polymerization. *J. Virol*., 84(15): 7857–7868.

Ling EJ, Yu XQ, 2006. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol*., 30(3): 289–299.

Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD, 2010. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J. Cell Biol*., 190(2): 187–195.

Ono C, Kamagata T, Taka H, Sahara K, Asano S, Bando H, 2012. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Res*., 165(2): 197–206.

Patankar AG, Giri AP, Harsulkar AM, Sainani MN, Deshpande VV, Ranjekar PK, Gupta VS, 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 31(4): 453–464.

Peng HY, Li X, Zhang SM, Arif BM, Chen XW, Hu ZH, 1998. Localization and cloning of the chitinase gene of, *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virol. Sin*., 13(2): 139–143. [彭辉银, 李星, 张双民, Arif BM, 陈新文, 胡志红, 1998. 中国棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆. 中国病毒学, 13(2): 139–143]

Rose C, Belmonte R, Armstrong SD, Molyneux G, Haines LR, Lehane MJ, Wastling J, Acosta-Serrano A, 2014. An investigation into the protein composition of the teneral *Glossina morsitans morsitans* peritrophic matrix. *PLoS Negl. Trop. Dis*., 8(4): e2691.

Tellam RL, 1996. The peritrophic matrix. In: Lehane MJ, Billingsley PF eds. Biology of the Insect Midgut. Springer, Netherlands. 86–114.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P, 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 29(2): 87–101.

Thiem SM, Miller LK, 1989. A baculovirus gene with a novel transcription pattern encodes a polypeptide with a zinc finger and a leucine zipper. *J. Virol*., 63(11): 4489–4497.

Toprak U, Erlandson M, Baldwin D, Karcz S, Wan L, Coutu C, Gillott C, Hegedus DD, 2016. Identification of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix proteins and enzymes involved in peritrophic matrix chitin metabolism. *Insect Sci*., 23(5): 656–674.

Wang P, Granados RR, 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(13): 6977–6982.

Wang P, Granados RR, 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol*., 72(1): 57–62.

Wang P, Granados RR, 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem*., 47(2): 110–118.

Wang Y, Wang Q, Liang CY, Song JH, Li N, Shi H, Chen XW, 2008. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid protein BV/ODV-C42 mediates the nuclear entry of P78/83. *J. Virol*., 82(9): 4554–4561.

Wang Y, Xiu JF, Cheng JZ, Luo M, Zhao P, Shang XL, Wang T, Wu JW, 2016. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the midgut of third instar larvae, *Musca domestica*. *Biomed. Environ. Sci*., 29(1): 56–65.

Zhang J, Zhang R, Ye CL, Xie X, 2011. *Drosophila*-derived GPCR Methuselah G protein coupled signal transduction pathway. *Chin. J. Cell Biol*., 33(8): 847–854. [张静, 张儒, 叶晨立, 谢欣, 2011. 果蝇来源的 GPCR Methuselah G 蛋白偶联信号转导通路研究. 中国细胞生物学学报, 33(8): 847–854]

Zhang N, Ge J, Zhou ZQ, Yin J, Zhong J, 2016. Expression and role of AcMNPV *bro* gene. *J. Fudan Univ.* (*Nat. Sci.*), 55(1): 128–132. [张楠, 葛晶, 周子谦, 尹隽, 钟江, 2016. AcMNPV *bro* 基因的表达和作用研究. 复旦学报(自然科学版), 55(1): 128–132]

Zhang XX, Liang ZP, Peng HY, Zhang ZX, Tang XC, Li G, Zhao SL, Xiao YZ, Zhang WJ, 2006. Effect of Congo red on peritrophic membrane of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and its viral-enhancing activity. *Acta Entomol. Sin*., 49(1): 45–49. [张小霞, 梁振普, 彭辉银, 张忠信, 汤显春, 李罡, 赵淑玲, 肖宇宙, 张万菊, 2006. 刚果红对棉铃虫中肠围食膜的影响及其病毒增效作用. 昆虫学报, 49(1): 45–49]

Zhong XW, Zhang LP, Zou Y, Yi QY, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2012. Shotgun analysis on the peritrophic membrane of the silkworm *Bombyx mori*. *BMB Rep*., 45(11): 665–670.

Zhu R, Peng JX, Hong HZ, 2003. Effects of fluorescent brightener on the peritrophic membrane structure of *Spodoptera exigua*. *Acta Entomol. Sin*., 46(4): 424–428. [朱蓉, 彭建新, 洪华珠, 2003. 光增白剂对甜菜夜蛾围食膜结构的作用与影响. 昆虫学报, 46(4): 424–428]

Zhuo LX, Huang YL, Yang JR, 1981. Study on artificial feed of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin*., 24(1): 110–112. [卓乐姒, 黄月兰, 杨家荣, 1981. 棉铃虫人工饲料的研究. 昆虫学报, 24(1): 110–112]

(责任编辑: 马丽萍)